

· 老年人认知功能障碍专栏 ·

Humanin 对实验性阿尔茨海默病小鼠海马小胶质细胞 OX-42 表达的影响

张新宇¹, 尹 榕², 付学锋^{1*}, 赵 波³, 万东君¹(兰州军区总医院: ¹干部病房, ²神经内科, 兰州 730050; ³兰州军区总医院 473 临床部神经内科, 兰州 730070)

【摘要】目的 探讨 Humanin (HN) 在体内是否存在对实验性阿尔茨海默病 (AD) 小鼠的神经保护作用以及可能的机制。**方法** 采用 β -淀粉样蛋白 (A β) 脑内注射方法建立 AD 模型。健康雄性小鼠 60 只, 随机分为假手术组 ($n=15$)、A β 模型组 ($n=15$) 和 HN 治疗组 ($n=30$)。应用免疫组织化学方法于造模后 3, 7, 14 d 观察海马小胶质细胞 OX-42 表达的变化; Nissl 染色方法检测 3 组动物海马区病理改变。**结果** OX-42 免疫组织化学染色显示, 与 A β 模型组比较, HN 治疗组造模后 3, 7, 14 d 海马 OX-42 阳性细胞的表达均减少 ($P < 0.05$); A β 模型组、HN 治疗组在手术后各时间点 Nissl 染色均可见海马区病理改变, HN 治疗组在相同时间点炎性的病理变化弱于 A β 模型组。**结论** 在活体内, HN 可以减少 A β_{25-35} 毒性引起的 OX-42 的表达, 具有神经保护作用。

【关键词】 阿尔茨海默病; Humanin 多肽; 小胶质细胞

【中图分类号】 R749.91

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00068

Effect of Humanin on microglia OX-42 expression in experimental Alzheimer's disease mice

ZHANG Xinyu¹, YIN Rong², FU Xuefeng^{1*}, ZHAO Bo³, WAN Dongjun¹(¹Cadre's Ward, ²Department of Neurology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area, Lanzhou 730050, China;³Department of Neurology, 473rd Clinical Division, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730070, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether Humanin (HN) has an *in vivo* neuroprotective effect on experimental mice with Alzheimer's disease (AD) and the possible mechanism. **Methods** AD models were established by intracerebral injection of β -amyloid protein (A β). A total of 60 healthy male mice were randomly divided into 3 groups: sham operated group ($n=15$), A β model group ($n=15$) and HN treatment group ($n=30$). Changes in expression of OX-42 in hippocampal region were observed by the immunohistochemical method on 3,7,14 days after modeling. Nissl staining was performed to detect the pathological changes of the hippocampal region of different groups of animals. **Results** The number of OX-42 positive cells in hippocampal region was reduced in HN treatment group on 3,7,14 days ($P < 0.05$). Pathological changes of the hippocampal region were detected by Nissl staining in both A β model group and HN treatment group after surgery, but the inflammatory changes of HN treatment group were less than A β model group at each time point. **Conclusion** *In vivo*, HN can reduce the expression of OX-42 induced by the toxicity of A β_{25-35} which proved that HN has neuroprotective effect.

【Key words】 Alzheimer's disease; humanin; Ser14Gly-humanin; astrocyte

随着老龄化社会的到来, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 越来越得到人们的重视。Humanin (HN) 是新近发现的一种多肽, 它能抑制淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、早老素 1 (presenilin-1, PS1)、早老素 2 (presenilin-2,

PS2) 突变和 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 等诱导的神经细胞死亡, 其在体外的抗细胞凋亡和神经保护作用已经被众多研究者证实^[1]。我们早期试验已经证实 HN 和 HN 肽链第 14 位氨基酸被 Gly 取代的突变体[Gly14]-Humanin (HNG) 在体内可有

效地抑制 A β 导致的胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的表达, 本研究通过检测 HN 对 A β 诱导的 OX-42 阳性细胞表达变化的影响, 旨在探讨 HN 在体内对于小胶质细胞是否同样存在神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性昆明小鼠 60 只, 2 月龄, 体质量 25~30 g, 由兰州军区总医院实验动物中心提供, 清洁级。随机分为假手术组 ($n=15$)、A β 模型组 ($n=15$) 和 HN 治疗组 ($n=30$)。

1.2 试剂

HN、A β_{25-35} 、羊抗兔 OX-42 单克隆抗体、链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin biotin-peroxidase complex, SABC) 为美国 Sigma 公司产品; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 AD 模型建立

参照 Tihda 等^[2]的方法, 腹腔注射 1%戊巴比妥溶液 50 mg/kg, 麻醉小鼠, 固定于立体定向仪, 按照小鼠脑立体定位图谱定位于右侧海马 CA1 区。应用微量注射器注入 A β_{25-35} 1 μ l (注射时间 10 min, 留针 10 min)。HN 治疗组在注射 A β 后立即在同一部位缓慢注入 100 μ mol/L HN 溶液 1 μ l (注射时间 10 min, 留针 10 min)。假手术组仅在相同部位入针, 操作同其他两组。动物放置于安静、温暖、避强光的环境中饲养。

1.4 OX-42 免疫组织化学染色

注射后分别于第 3, 7, 14 d 处死小鼠。鼠脑连续切片, 切片厚度 30 μ m, 隔 4 张取 1 张。先后加入 OX-42 一抗 (1:200)、二抗 (1:500)、SABC (1:500), 采用硫酸镍氨加强法 DAB 显色, 操作按照说明书。阴性对照组采用同样浓度的普通兔免疫球蛋白 (IgG) 代替一抗, 其他步骤相同。

1.5 尼式染色

冷冻切片经二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇下行入水, 后用 1%焦油紫染色 30 min。蒸馏水清洗, 70%乙醇分色数秒至数分钟, 经 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇各 2 min 脱水, 无水乙醇脱水 5 min, 二甲苯透明后树胶封固。

1.6 图像分析处理

采用 Image pro plus 5.0 软件对组织切片进行定量分析。每只大鼠取 4 张切片, 200 倍视野下, 于每张切片血肿周边随机选取 4 个视野, 测出单位面积的 OX-42 阳性细胞数。

1.7 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计分析软件进行分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差分析进行多组均数检验, 并用 LSD- t 检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学方法检测 3 组小鼠海马区小胶质细胞 OX-42 蛋白的改变

A β 组小鼠经 A β 刺激后 3d, 小胶质细胞被激活, 转化为活化状态, 以注射点为中心, 注射侧海马 OX-42 阳性细胞明显深染、体积增大、数量增多, 并达到峰值; 细胞形态清楚, 胞体肥大、肿胀, 突起增粗延长; 注射对侧海马也出现活化 OX-42, 细胞增多、体积增大, 但较注射侧弱; 随时间延长, 7, 14d 观察可见 OX-42 仍深染, 细胞数逐渐减少, 但仍多于假手术组, 胞体仍有肥大、突起增粗延长。而 HN 治疗组在各时间段小胶质细胞体积均明显小于模型组, 且突起减少; 阳性细胞数目多于假手术组, 但少于模型组 ($P < 0.05$; 图 1, 表 1)。

2.2 尼式染色检测 3 组小鼠海马区病理改变

A β 模型组、HN 治疗组在手术后各时间点 Nissl 染色可见皮质有针刺道, 部分有皮质缺损, 边缘不整; A β 模型组注射侧海马变形, 有明显炎性细胞浸润、肿胀以及胶质细胞增生, CA1~CA3 区锥体细胞消失或排列稀疏、紊乱, 其中炎性的病理变化在注射点最重, 其周围逐渐减轻, 随着时间的推移, 上述病理变化减弱; HN 治疗组在相同时间点炎性的病理变化弱于 A β 模型组。

3 讨论

老年斑是 AD 的主要病理特征之一。在以 A β 为核心的老年斑周围聚集着大量活化的小胶质细胞和星形胶质细胞, 同时在神经纤维缠结、损伤的毛细血管周围亦发现有大量的胶质细胞存在, 但其密度最高的部位是在炎性老年斑内及其周围。在 AD 疾

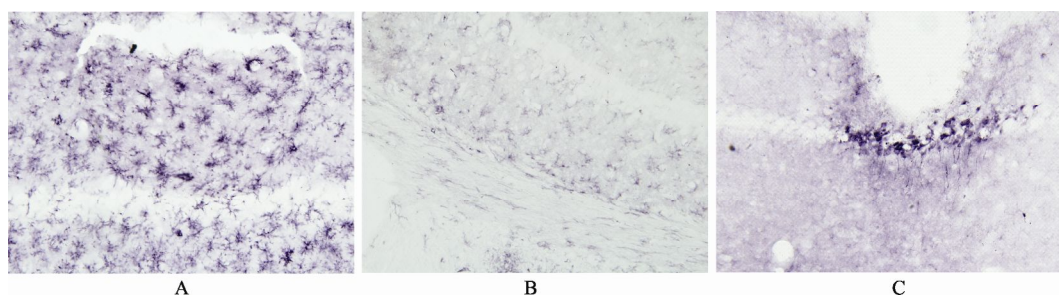


图 1 Aβ刺激后 3d 海马 OX-42 阳性细胞

Figure 1 Expression of OX-42 in hippocampal region on day 3 (SABC ×200)

A: Aβ 模型组; B: HN 治疗组; C: 假手术组

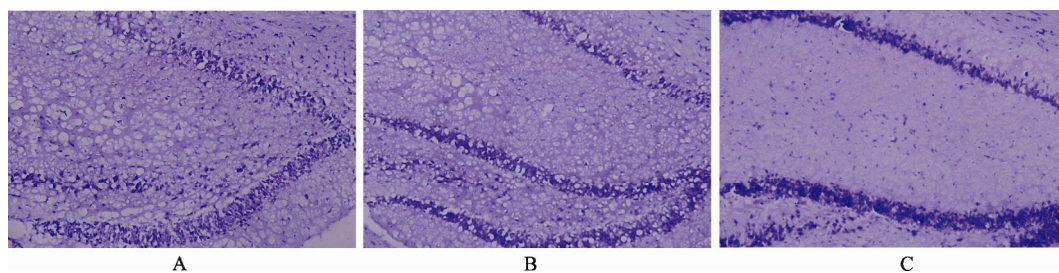


图 2 海马区病理改变

Figure 2 Pathological changes of hippocampus on day 3 (Nissl staining ×200)

A: Aβ 模型组; B: HN 治疗组; C: 假手术组

表 1 3 组小鼠海马阳性 OX-42 细胞数的变化

Table 1 Numbers of OX-42 positive cells

in hippocampal region (n = 15, $\bar{x} \pm s$)

组别	3d	7d	14d
假手术组	88.3 ± 3.0	65.5 ± 4.8	61.5 ± 2.7
Aβ 模型组	199.0 ± 7.7	168.8 ± 14.1	137.8 ± 5.0
HN 治疗组	118.8 ± 13.1*	113.6 ± 9.1*	92.8 ± 9.7*

注: 与 Aβ 模型组比较, *P < 0.05

病的早期,小胶质细胞可吞噬外源性 Aβ 纤维,吞噬 Aβ 后的小胶质细胞被激活,激活的小胶质细胞在 Aβ 和神经炎性斑块等病理损害的细胞应答中具有重要作用。研究表明,星形胶质细胞活化后,产生的炎性因子能够促进 Aβ 聚集,并进一步激活小胶质细胞,从而形成恶性循环,加重老年斑周围的炎症反应^[3]。越来越多的研究证据表明,炎症反应在 AD 形成和发展过程中具有重要作用,但迄今仍缺乏有效的防治措施^[4]。

HN 是近年来发现的一种新的内源性神经保护因子,由 24 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 2656.3。HN 是目前发现的一种既可以抑制多种黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 引起的细胞毒性,又可抑制 Aβ 神经毒性的神经保护因子^[5]。体外研究证明,HN 能够抑制所有的由 FAD 突变体引起的神经细胞死亡^[6];HN 还能阻断由 Aβ 和抗 APP 抗体在初级神经元中引起的细胞毒性^[7];众

多的体外研究表明,HN 在微克水平即可表现出神经保护作用^[8];Miao 等^[9]的实验证实,HNG 可以有效地改善实验性 AD 小鼠神经行为缺陷。我们先期的实验发现,HN 及 HNG 在体内均可有效地抑制 Aβ 毒性导致的 GFAP 表达,这种改变有时间依赖特征,与剂量及浓度显著相关,且 HNG 的生物活性作用较 HN 组更强^[10]。

本研究通过观察 HN 对 AD 模型小鼠海马区小胶质细胞表达的影响作用,发现应用 HN 治疗后,海马区 Aβ 注射中心的组织坏死区域范围明显缩小,OX-42 的表达显著减少。

总之,本研究表明,HN 在体内可有效地抑制 Aβ 毒性导致的 OX-42 表达,说明 HN 可以有效治疗 Aβ 诱导的 AD 大鼠模型,具有神经保护作用。HN 是否通过抗炎性反应途径而发挥抗 AD 的神经保护作用,仍需要进一步检测其对炎性细胞介质表达的影响加以证明。

【参考文献】

- [1] Chiba T, Nishimoto I, Aiso S, *et al*. Neuroprotection against neurodegenerative diseases: development of a novel hybrid neuroprotective peptide Colivelin[J]. *Mol Neurobiol*, 2007, 35(1): 55-84.
- [2] Tihda C, Tamura T, Komatsu K. Repair of amyloid

- beta(25-35)-induced memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to[J]. Brain Res, 2003, 990(1-2): 141-147.
- [3] Li DB, Tang J, Fan XT, *et al.* Comparative study of histopathology changes between the PS1/APP double transgenic mouse model and Abeta1-40 -injected rat model of Alzheimer's disease[J]. Neurosci Bull, 2006, 22(1): 52-57.
- [4] Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 289-305.
- [5] Arakawa T, Niikura T, Kita Y. The biological activity of Humanin analogs correlates with structure stabilities in solution[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49(1): 93-97.
- [6] Arakawa T, Kita Y, Niikura T. A rescue factor for Alzheimer's diseases: discovery, activity, structure, and mechanism[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(21): 2086-2098.
- [7] 胥显民, 王廷杰, 陈显久, 等. [Gly14]-Humanin 多肽对 β 淀粉样蛋白引起的神经干细胞毒性的拮抗作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(8): 1623-1627.
- [8] Rossini L, Hashimoto Y, Suzuki H, *et al.* VSTM2L is a novel secreted antagonist of the neuroprotective peptide Humanin[J]. FASEB J, 2011, 25(6): 1983-2000.
- [9] Miao J, Zhang W, Yin R, *et al.* S14G-Humanin ameliorates Abeta25-35-induced behavioral deficits by reducing neuroinflammatory responses and apoptosis in mice[J]. Neuropeptides, 2008, 42(5-6): 557-567.
- [10] 尹 榕, 李柱一, 苗建亭, 等. HN 和 HNG 对 AD 小鼠海马星形胶质细胞激活影响的实验研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2009, 11(6): 457-460.
- (编辑: 任开环)

· 消 息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》征稿启事

《中华老年多器官疾病杂志》是由中国人民解放军总医院主管、解放军总医院老年心血管病研究所主办的医学期刊,创办于 2002 年。本刊是国内外唯一的一本反映老年多器官疾病的期刊,主要交流老年心血管疾病,尤其是老年心血管疾病合并其他疾病,老年两个以上器官疾病及其他老年多发疾病的诊治经验与发病机制的研究成果。开设的栏目有述评、综述、临床研究、基础研究等。

本刊热忱欢迎从事心脏病学及其相关领域的专家学者踊跃投稿,我们真诚期待您的关注和参与。

地址: 100853 北京市复兴路 28 号,解放军总医院老年心血管病研究所

100088 北京市西城区德胜门外大街 83 号德胜国际中心 B 座 301 室,北京中科期刊出版有限公司

电话: 010-66936756; 010-59790736-8087

传真: 010-59790736-8092

电子邮箱: zhldnqg@mode301.cn

在线投稿: <http://www.mode301.cn/ch/author/login.aspx>